

# 药用裸花紫珠微繁技术增殖培养基筛选研究

潘 梅, 符瑞侃, 黄 赛, 王景飞, 吕德任, 戚华莎

(海南省农业科学院 园林花卉研究所, 海南 海口 571100)

**摘 要:**以裸花紫珠丛生芽为外植体,在光照时间 9 h/d,光照强度 1 500 lx,温度 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$ , pH 5.8 的培养条件下,研究比较了不同无机盐量 MS 培养基、不同植物生长调节剂种类及配比、蔗糖浓度、培养周期等因素对裸花紫珠生长状况的影响,以期筛选出裸花紫珠微繁技术最佳增殖培养基。结果表明:丛生芽继代增殖的最佳配方为:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L,30 d 的增殖系数达到 10 以上,丛生芽长势好。

**关键词:**裸花紫珠;丛生芽;增殖培养;筛选

**中图分类号:**Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0096-04

裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. ex Am)属马鞭草科紫珠属多年生小灌木植物,主产于海南省,广东、

**第一作者简介:**潘梅(1962-),女,广西人,高级园艺师,现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail:panmei200@sina.com.

**基金项目:**海南省科学事业费资助项目(FJSB 214.04.00.001.00);海南省自然科学基金资助项目(312084)。

**收稿日期:**2013-10-24

广西省也有分布。裸花紫珠是一种珍贵的药材,其根、茎、花、果均可入药。裸花紫珠化学成分主要包括黄酮类、萜类、挥发油类及酚类等,具有抗癌、清热解毒、消炎生肌、凉血止血等功效<sup>[1-2]</sup>,目前已制成多种成品药剂,其临床应用非常广泛,主治细菌感染引起的炎症、急性传染性肝炎、呼吸道和消化道出血等多种疾病,市场需求量极大。另外,裸花紫珠花冠紫色,果实球形,株形美

化现象越严重。其原因是高温条件下可使 PPO 活性提高,从而加速外植体的褐变。赵伶俐<sup>[4]</sup>在蝴蝶兰外植体褐化的影响因素研究中表明,褐化率的多少与温度的高低成正比。光照强度在一定范围内(1 000~3 000 lx 之间)对中华红叶杨外植体的褐变影响不明显,但许传俊等<sup>[5]</sup>在蝴蝶兰外植体褐变的研究中认为随着光照强度的加强,外植体的褐化率加重,具体原因有待进一步研究。

## 参考文献

[1] 刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2003.

[2] 朱学静,金华,殷鸣放,等.‘小×胡 8 号杨’组织培养中的褐化控制研究[J].辽宁林业科技,2007(4):19-21.

[3] 王娟,田建保,贺小红,等.“金薄香”核桃组培中灭菌及防止褐变的研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2008,28(3):290-292.

[4] 赵伶俐.蝴蝶兰组培外植体褐化影响因素的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.

[5] 许传俊,李玲.几种培养基及光照对蝴蝶兰叶片外植体褐变的影响[J].亚热带植物科学,2006,35(1):9-12.

## Effect of Temperature and Light Condition on Explants Browning of *Populus×euramericana* cv. *Zhonghuahongye*

LI Shu-li

(Binzhou Polytechnic College, Binzhou, Shandong 256603)

**Abstract:** Taking the stem of *Populus×euramericana* cv. *Zhonghuahongye* as explant, the effect of temperature and light condition on explants browning of it were studied. The results showed that low temperature pretreatment combined with simple culture medium culture could decrease browning rate and had a good browning decreasing effect; dark culture decreased browning rate effectively at the first stage and ten days was an optimum; temperature also affected browning rate, within a certain range the higher the temperature was, the more serious the browning was, and low temperature lightened browning; the light intensity in 1 000~3 000 lx could not cause an obvious effect for the browning rate.

**Key words:** *Populus×euramericana* cv. *Zhonghuahongye*; temperature; light; browning; effect

观,极具观赏价值,是园林绿化的优良树种。裸花紫珠常规情况下用播种和扦插繁殖,但种子出苗率低,扦插繁殖系数小,繁殖速度慢,不易获得大量的种苗,严重制约了裸花紫珠的规模化生产。目前裸花紫珠药材的原料供应仍以野生采伐为主,难以满足市场日益增大的需求,而且野生资源破坏严重,日渐枯竭。因此,对裸花紫珠种苗的人工繁育和规模化生产极为必要。目前,国内对裸花紫珠的生物学特性、化学成分、药用价值、药理作用以及临床应用的研究报道较多<sup>[3-9]</sup>,而其种苗的人工繁育仅在种子播种和枝条扦插方面有少量的报道<sup>[10-12]</sup>,裸花紫珠的组织培养尚鲜见报道<sup>[13]</sup>。现以裸花紫珠茎段诱导的丛生芽作为试材,研究了 MS 培养基无机盐用量、植物生长调节剂种类及其配比、蔗糖浓度以及培养周期对丛生芽增殖的影响,以期筛选出最佳的丛生芽增殖培养条件,提高繁殖系数,降低生产成本,实现裸花紫珠工厂化育苗和规模化生产,满足其药源供应。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为裸花紫珠幼嫩茎段诱导的丛生芽。

### 1.2 试验方法

剪取裸花紫珠幼嫩茎段在流水下冲洗除去表面污物后,将其切成 3 cm 左右的带节小段,在超净工作台上先用 75%酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1%升汞浸泡 20 min,无菌水漂洗 4~5 次,将两端各切去少许后接入诱导培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L。

茎段在诱导培养基上培养 7 d 后开始萌发,培养 30 d 新芽高 2~3 cm,有 2~3 个茎节(图 1A),新萌发的幼茎切成小段后继续接种于新的培养基中进行增殖,即可获得大量的丛生芽。

在基本培养基中添加不同种类和浓度的植物生长调节剂,除蔗糖浓度试验项外,所有培养基中添加食用蔗糖 30 g/L,卡拉胶 6 g/L,pH 5.8。取生长状况一致小芽,以 3 个小芽为单位切分接种于各种培养基上,每袋接种 3 丛,每种处理接种 10 袋,重复 3 次,定期观察记录,30 d 后统计结果。材料接种后,在光照强度 1 500 lx 光照下培养,光照时间 9 h/d,温度(26±2)℃。

1.2.1 不同无机盐量 MS 对丛生芽增殖的影响 以 1/2MS、3/4MS、MS 作为基本培养基,各添加 6-BA 2.0 mg/L,共 3 种处理。

1.2.2 不同种类细胞分裂素对丛生芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,分别添加 6-BA、KT 和 ZT 各 2.0 mg/L,共 3 种处理。

1.2.3 不同生长调节剂组合对丛生芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,设 6-BA 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 与 NAA 0.05、0.10、0.15、0.20 mg/L 不同配比,共 20 种处理。

1.2.4 不同蔗糖浓度对丛生芽增殖的影响 以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为基本培养基,设置蔗糖浓度 20、30、40 g/L,共 3 种处理。

1.2.5 不同培养时间对丛生芽增殖的影响 以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为培养基,设置 20、25、30、35、40 d 的培养周期,共 5 种处理。

### 1.3 数据分析

采用方差分析法, $F$  测验显著后用新复极差法(SSR)进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同无机盐量 MS 培养基对丛生芽增殖的影响

由表 1 可知,不同无机盐量 MS 培养基对丛生芽增殖生长的影响不同,丛生芽的增殖系数与无机盐用量呈正相关,1/2MS 时丛生芽的增殖效果最差,其增殖系数最小,仅为 3.54,而且丛芽长势差,叶黄化;3/4MS 时丛生芽的增殖系数增大,长势也较好,叶绿色;全量的 MS 对丛生芽的增殖生长最好,其增殖系数达到 8.80,且生长健壮。方差分析结果表明,MS 与 1/2MS、3/4MS 之间达差异极显著水平,因此,裸花紫珠丛生芽的增殖培养宜选用全量的 MS 培养基。

表 1 不同 MS 无机盐量对丛生芽增殖的影响

Table 1 Effect of different MS inorganic salt on clustered buds propagation

培养基	增殖系数	生长状况
1/2MS	3.54Cc	分化少,长势差,叶黄
3/4MS	6.29Bb	分化较少,长势较好,叶绿
MS	8.80Aa	长势好,整齐健壮,叶绿

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

### 2.2 不同种类细胞分裂素对丛生芽增殖的影响

由表 2 可知,在 3 种不同细胞分裂素的培养基中培养,丛生芽增殖系数差异较大,其中 6-BA 的增殖系数最高,达到 8.87,其次是 KT 为 3.22,最低的是 ZT 为 2.88。从生长情况看,在含 6-BA 的培养基中,丛芽生长整齐健壮,芽苗高,有利于后续的生根培养;而在含 KT 的培养基中,芽苗长势差,节较密苗矮小;含 ZT 的培养基诱导分化的丛芽则不整齐,而且 KT 和 ZT 培养基中均出现少量的死苗。方差分析结果也表明,6-BA 与 KT 和 ZT 间的差异达到极显著水平,而 KT 与 ZT 之间的差异不显著。因此,裸花紫珠丛生芽增殖培养中细胞分裂素宜选用 6-BA。

表 2 不同种类细胞分裂素对丛生芽增殖的影响

Table 2 Effect of different types of cytokinins on clustered buds propagation

细胞分裂素 /mg·L <sup>-1</sup>	增殖系数	生长状况
6-BA	8.87Aa	芽苗长势好,整齐健壮,芽苗高,叶绿
KT	3.22Bb	芽苗长势差,节较密,芽苗矮,叶绿,有死苗
ZT	2.88Bb	芽苗长势较差,不整齐,节间长,叶绿,有死苗

## 2.3 不同植物生长调节剂组合对丛生芽增殖的影响

从表3可以看出,不同的6-BA和NAA浓度对比对裸花紫珠丛生芽的增殖生长影响极大,较低和较高浓度的6-BA对丛生芽的增殖效果都不理想。适宜的6-BA浓度为2.0 mg/L,当6-BA低于2.0 mg/L时,丛生芽增殖系数较低,均在6.0左右;6-BA高于2.0 mg/L时,丛生芽增殖系数也较低;6-BA浓度为3.0 mg/L时,丛生芽增殖系数最小,均低于5.0,而且出现玻璃化苗,植株矮小,苗高仅1.2~1.5 cm。以6-BA 2.0 mg/L和NAA 0.05 mg/L的组合丛生芽的增殖效果最好,增殖系数最大达到10.73,芽苗高、浓绿而健壮。方差分析结果表明,该组合与其它19个组合间增殖系数的差异达到极显著水平,因此,裸花紫珠丛生芽增殖培养的最优组合为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

表3 不同植物生长调节剂组合对丛生芽增殖的影响

Table 3 Effect of different plant growth regulators combination on clustered buds propagation

编号	激素配比/mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	NAA	增殖系数	丛生芽生长状况
1	1.0	0.05	5.30FG	长势较好,高1.6 cm
2	1.0	0.10	5.38FG	长势较好,高1.8 cm
3	1.0	0.15	5.01FGH	长势一般,高1.5 cm,有少量根
4	1.0	0.20	4.80FGH	长势差,弱,高1.6 cm,有少量根
5	1.5	0.05	6.89D	长势较好,高2.0 cm
6	1.5	0.10	5.63EF	长势一般,节密,高1.8 cm
7	1.5	0.15	6.82D	长势好,高2.2 cm
8	1.5	0.20	5.56FG	长势较好,高2.0 cm,有少量根
9	2.0	0.05	10.73A	长势好,健壮,高2.7 cm
10	2.0	0.10	8.59B	长势好,健壮,高2.3 cm
11	2.0	0.15	8.33B	长势好,健壮,高2.2 cm
12	2.0	0.20	5.76EF	长势较好,较壮,高1.8 cm
13	2.5	0.05	7.97BC	长势好,高2.3 cm,有少量根
14	2.5	0.10	7.09CD	长势好,较壮,高2.5 cm
15	2.5	0.15	6.56DEF	长势较好,高2.1 cm
16	2.5	0.20	5.78EF	长势一般,高2.0 cm
17	3.0	0.05	4.99FGH	长势一般,较弱,高1.5 cm
18	3.0	0.10	4.29H	长势差,细弱,高1.5 cm,少量玻璃化
19	3.0	0.15	4.47GH	长势差,节密,高1.4 cm,少量玻璃化
20	3.0	0.20	4.28H	长势差,节密,高1.2 cm,少量玻璃化

## 2.4 不同蔗糖浓度对丛生芽增殖的影响

从表4可以看出,丛生芽在4种蔗糖浓度中均能诱导分化芽,但在不含蔗糖的培养基中芽分化极少,增殖系数仅为1.76,芽苗细弱,叶黄化并出现少量死株;含蔗糖20 g/L和40 g/L的处理增殖系数也较低,分别为7.48和8.57,二者之间达到差异显著水平;含蔗糖30 g/L的处理增殖系数最大达到10.59,与其它处理间达到极显著差异水平,而且丛生芽浓绿生长势好。因此,裸花紫珠丛生芽增殖培养的蔗糖浓度以30 g/L为宜。

## 2.5 培养时间对丛生芽增殖的影响

丛生芽在同一培养基中培养不同时间的生长情况

表4 不同蔗糖浓度对丛生芽增殖的影响

Table 4 Effect of different sucrose concentration on clustered buds propagation

蔗糖浓度/g·L <sup>-1</sup>	增殖系数	生长状况
0	1.76Cd	芽苗细弱,叶黄,少量死株
20	7.48Bc	芽苗较细,叶绿色
30	10.59Aa	芽苗健壮,叶浓绿色
40	8.57Bb	芽苗黄绿色,叶片较小

见表5。培养20 d时,丛芽已经有了明显的分化,芽增殖系数为6.83;随着培养时间的延长,芽的增殖系数不断增加,30 d时增殖系数已达到10.67,芽苗生长状况好(图1B)。随后芽的生长缓慢,40 d时开始出现少量死株。方差分析结果表明,30、35、40 d处理间丛生芽增殖系数在0.01水平差异不显著,而与20、25 d处理的达到极显著差异水平。从增殖系数和生长情况两方面考虑,裸花紫珠丛生芽增殖培养时间以30~35 d为佳。

表5 培养时间对丛生芽增殖的影响

Table 5 Effect of cultural time on clustered buds propagation

培养时间/d	增殖系数	生长状况
20	6.83Cc	芽苗高1.5 cm左右
25	8.49Bb	芽苗高2.0 cm左右
30	10.67Aa	芽苗高2.5 cm左右
35	10.89Aa	芽苗高2.8 cm左右
40	10.95Ab	芽苗高3.0 cm左右,出现少量死株

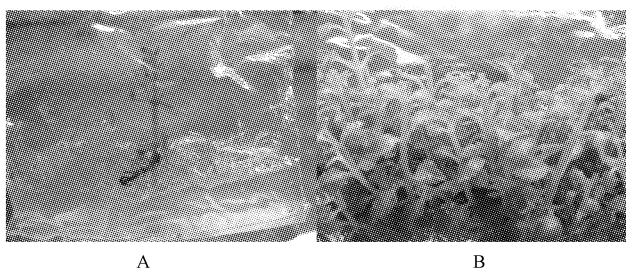


图1 裸花紫珠增殖培养

注:A.茎段萌芽;B.培养30 d的丛生芽。

Fig. 1 Propagation culture of *Callicarpa nudiflora*

Note: A. Stem sprout; B. Clustered buds of culture for 30 d.

## 3 结论与讨论

在植物组织培养中,快速繁殖实现工厂化育苗的一个重要环节就是继代增殖培养,而研究筛选适宜的增殖培养基是获得高效增殖和高质量芽苗的关键。裸花紫珠是以分生芽和茎节2种方式进行增殖,芽的分化率及苗的茎节数影响其增殖率。该试验结果表明,培养基的无机盐用量、植物生长调节剂的种类及配比、蔗糖浓度以及培养周期对裸花紫珠丛生芽的增殖均有影响。

培养基中的无机营养成分是组成植物生命体的主要元素,会影响植物的生长与分化。该试验中,丛生芽在1/2MS和3/4MS的培养基上增殖系数小,生长势差,而在全量的MS培养基上增殖效果好,这可能是由于全量的无机盐营养丰富,可以支持培养物的快速生长。

植物生长调节剂对芽苗的生长发育影响极大,细胞分裂素能促进芽的分化,而其与生长素的配比合适时,试管苗能理想地分化和生长,达到最佳的增殖效果<sup>[14]</sup>,这在裸花紫珠丛生芽的增殖培养中也有着同样的表现。6-BA 的增殖效果极显著优于 KT 和 ZT;6-BA 和 NAA 的配合能有效控制芽的分化和苗的伸长,当 6-BA 为 2.0 mg/L, NAA 为 0.05 mg/L 时达到最佳的增殖效果;6-BA 达到 3.0 mg/L 时会引起丛生芽出现玻璃化现象。在植物组织培养中出现玻璃化现象的影响因素较多,培养容器内的空气湿度和通气条件、高温培养及温度不稳定、琼脂和蔗糖浓度以及 6-BA 浓度过高均会产生玻璃苗<sup>[14]</sup>。该试验中,6-BA 浓度低于 3.0 mg/L 时未有玻璃化苗出现,因此裸花紫珠的玻璃化苗应是主要受 6-BA 浓度的影响。

蔗糖在组织培养中主要作为碳源和能源物质,同时可以调节培养基的渗透压<sup>[14]</sup>。糖的浓度与细胞的增殖和分化有关<sup>[15]</sup>。在该试验中,蔗糖对裸花紫珠丛生芽分化生长的作用十分明显,过高或过低的蔗糖均不利于丛生芽的增殖生长,在 0~30 g/L 的浓度范围内,丛生芽的增殖率及其质量与蔗糖浓度呈正相关;当达到 40 g/L 时丛生芽增殖系数下降,蔗糖 30 g/L 与其它处理的差异达到极显著水平,而且芽苗浓绿健壮,因此,裸花紫珠丛生芽增殖培养的最佳蔗糖浓度为 30 g/L。

适宜的培养周期可以影响丛生芽的增殖率和生长状态,在大规模工厂化育苗中与生产成本的控制有着极大的关系。该试验中,随着培养时间的延长,芽的分化数增加、芽苗伸长,30 d 后达到最佳生长状态,但 40 d 时开始出现少量死株,这可能与裸花紫珠增殖率大,营养物质消耗快有关。因此,在裸花紫珠丛生芽的增殖培养中应控制好接种芽数,培养周期不宜过长,以 30~35 d 为佳。

综合该试验结果,在培养温度为 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度为 1 500 lx 的培养条件下,裸花紫珠丛生芽增殖的最

佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L,培养周期 30~35 d,丛生芽的增殖效果最好,其增殖率高,芽苗生长健壮。用此培养基进行裸花紫珠的增殖培养,如增殖系数以 10 计,30 d 为培养周期,不考虑污染情况,则 1 个芽在半年时间里可繁殖 100 万株苗。因此该增殖体系可以实现裸花紫珠种苗的快速繁殖,为大规模高效低成本工厂化育苗奠定了技术基础。

### 参考文献

- [1] 白晶. 中药裸花紫珠研究现状[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009(2): 8-9.
- [2] 蔡金平,董琳,关徽徽,等. 裸花紫珠的研究进展[J]. 现代药物与临床 2012, 27(1): 60-64.
- [3] 王祝元,韩壮,崔海滨,等. 裸花紫珠的化学成分[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(4): 359-362.
- [4] 王和飞,张燕,文攀,等. 裸花紫珠地上部分总糖的测定[J]. 天津农业科学, 2012, 18(1): 28-30.
- [5] 张洁,李宝泉,冯峰,等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 35(24): 3297-3301.
- [6] 符健,廖少铁,王世雄. 裸花紫珠片的抗菌消炎和止血作用研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2002(2): 154-157.
- [7] 席作武,高宗跃,牛明了. 裸花紫珠片治疗肛肠病术后出血临床研究[J]. 中医学报, 2010(1): 136-137.
- [8] 马丽丽,刘萍. 裸花紫珠栓治疗宫颈炎疗效观察[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(8): 1144.
- [9] 刘中文. 裸花紫珠胶囊与诺氟沙星联用治疗急性菌痢临床观察[J]. 中国民康医学, 2008(15): 1754.
- [10] 黄秋银,蓝祖裁,潘春柳,等. 裸花紫珠种子萌发影响因素研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 12006-12007.
- [11] 聂焱,吴永忠,余宝平,等. 裸花紫珠种苗繁育与栽培技术[J]. 现代园艺, 2010(12): 23-24.
- [12] 唐燕. 裸花紫珠扦插繁育技术[J]. 农技服务, 2012, 29(9): 1026.
- [13] 潘梅,黄赛,王景飞,等. 药用植物裸花紫珠的组织培养与快速繁殖研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(7): 127-132.
- [14] 王玉英,高新一. 植物组织培养技术手册[M]. 北京:金盾出版社, 2011: 39, 42, 113-114.
- [15] 涂艺声. 经济植物大规模快速繁殖技术[M]. 北京:化学工业出版社, 生物·医药出版分社, 2009: 33.

## Screening Study on Proliferation Medium of Micropropagation Technique for *Callicarpa nudiflora*

PAN Mei, FU Rui-kan, HUANG Sai, WANG Jing-fei, LV De-ren, QI Hua-sha

(Institute of Garden Flower, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100)

**Abstract:** Taking the clustered buds of *Callicarpa nudiflora* as the explant, the effect of inorganic salt types and concentrations of plant growth regulators, sucrose concentration, culture cycle and other factors on growth of *Callicarpa nudiflora* were studied under the conditions as light time 9 h/d, light intensity of 1 500 lx, temperature of  $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$  and pH 5.8, in order to screen the optimum proliferation medium of micropropagation technique. The results showed that the best formula for clustered buds subculture proliferation was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+sucrose 30 g/L, proliferation coefficient was over 10 in 30 d and clustered buds growth were potential.

**Key words:** *Callicarpa nudiflora*; clustered buds; proliferation culture; screening